

極低負荷領域で駆動する細菌べん毛モーターの回転速度と固定子ユニット数の関係

著者	石田 翼
出版者	法政大学大学院理工学研究科
雑誌名	法政大学大学院紀要．理工学・工学研究科編
巻	60
ページ	1-2
発行年	2019-03-31
URL	http://doi.org/10.15002/00022099

極低負荷領域で駆動する細菌べん毛モーターの 回転速度と固定子ユニット数の関係

SPEED OF THE BACTERIAL FLAGELLAR MOTOR AT EXTREMELY LOW LOAD DEPENDS ON THE NUMBER OF STATOR UNITS

石田 翼

Tsubasa ISHIDA

指導教員 曾和 義幸

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻修士課程

The bacterial flagellar motor is a rotary nano-machine which is powered by ion flux across the cytoplasmic membrane. The motor consists of a rotor surrounded by multiple torque-generating stator units. To reveal how the motor works, its dynamic properties under various mechanical load conditions are required. In this study, we developed an assay to monitor the motor rotation at extremely low load. We attached a 60 nm gold-nanoparticle directly to the straight hook via Cysteine residues, and monitored its motion by back-scattering microscopy. We observed that flagellar motor shows a stable rotation at ~300 Hz near zero load when the protein expression level of stator units was high; whereas multiple speed levels when that was low. We also detected motor rotation in discrete speed increments by inducing expression of stator proteins in cells lacking stator proteins. These results indicate that speed of the flagellar motor at extremely low load depends on the number of stator units.

Key Words: bacterial flagellar motor, molecular machine, high-resolution microscopy

1. 緒言

大腸菌などの運動性細菌の多くは、べん毛繊維を回転させて水中を遊泳する。べん毛繊維の回転は、その根元の細胞膜に存在するモーターによって駆動される。べん毛モーターは、回転子と複数の独立に機能する固定子ユニットによって構成される直径約 45 nm の微小な構造体である。固定子ユニットは、イオンチャネルとしての機能を持ち、共役イオンが細胞膜の電気化学ポテンシャル差に従って流入する際に発生する自由エネルギーをモーターの回転力に変換する。また、固定子ユニットは常に一定の数モーターに組み込まれるのではなく、環境の負荷に応じて組み込み数が調整される。

微小な分子モーターの運動計測には、十分なシグナルを得るための目印が必要である。従来の研究では、直径 1 μm 程度のビーズを目印としてべん毛繊維に付着させる手法が用いられてきたが、その条件では遊泳時と比べて 10 倍以上の高い負荷がモーターにかかる。そのような高負荷条件下では、大きな回転力を生み出すために、最大 10 個以上の固定子ユニットが同時にモーターに組み込まれて機能する[1]。また、サブミクロンサイズの比較的小さい目印を用いた遊泳時と同程度の負荷条件下では、固定子ユニットの数は少なく調節されることも知られている[2]。近年、極低負荷領域で駆動するモーターの機能を調べるため、金

ナノ粒子を用いたべん毛モーター回転計測がおこなわれた。興味深いことに、この条件における回転速度と固定子ユニット数の関係について、大きく異なる結果が報告されている。一つ目は、モーター回転速度は固定子ユニット数に依存せず、1つのユニットのみで最大速度に達すると結論付けており[3]、二つ目は、最大速度に達するためには複数のユニットが必要であり、速度はユニット数に依存すると結論付けている[4]。本研究では、回転標識法の改善をおこなうことで計測系を最適化し、極低負荷領域で駆動するモーターの固定子発現量を制御して回転速度に与える影響を調べた。

2. 実験方法

本研究では、直線形状の長いべん毛フックを持ち、べん毛繊維を持たない大腸菌変異体を用いた[5]。また、フック構成タンパク質 FlgE に、フックの表面に位置するようにシステイン残基を挿入している。このシステインがもつチオール基に直径 60 nm の金ナノ粒子を共有結合させた(図 1)。この粒子にレーザー光を

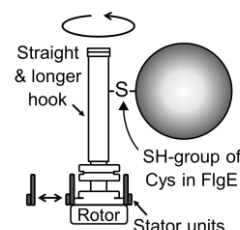


図 1 本研究におけるべん毛モーター回転標識の模式図

照射し、その後方散乱光を高速カメラで高感度に撮影した。粒子の動きは 1 kHz のフレームレートで撮影し、その動画の各フレームの粒子の重心位置を求めた。その後、フーリエ変換により最も強いピークをもつ周波数をモーターの回転速度とし、その経時的変化を求めた。また、回転速度が固定子ユニット数に依存するかを調べるため、大腸菌ゲノム上から固定子を発現させる遺伝子を欠失させ、IPTG により固定子の発現誘導が可能なプラスミドを移入した。

3. 実験結果と考察

(1) 粒子の回転半径

直線状のべん毛フックに直径 60 nm の金ナノ粒子を結合させて回転を観察した (図 2A)。また、複数のモーターについて、粒子の軌道から回転半径を求めたところ、回転半径は約 40 nm となった (図 2B)。フックの直径が約 18 nm であることを考慮すると、この実験結果は予想される粒子の回転軌道の半径である約 39 nm とよく一致した。なお、先行研究において、本来の屈曲した柔軟な構造のフックに、抗体を介して金ナノ粒子を付着させていたことと比較すると、本研究で確立した実験系は、低負荷条件下でのモーター回転計測を最も安定に実現しているといえる。

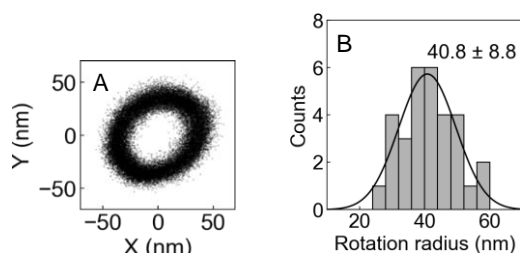


図2 (A) 粒子の回転軌道, (B) 回転半径のヒストグラム

(2) 固定子発現量が回転速度に与える影響

誘導物質 IPTG による固定子の発現調整が可能な株を用いて、固定子発現量を変化させたモーターの回転計測をおこなった。その結果、固定子の発現レベルが高い時にはモーターが約 300 Hz の回転速度で安定したのに対して、低い時には複数の速度レベル間で急激に変化する様子が観察された (図 3)。この速度変化は、固定子ユニットの自発的な離合集散を反映していると考えられる。つまり、極低負荷領域においても、複数の固定子ユニットがモーターのトルク発生に関わることを示している。

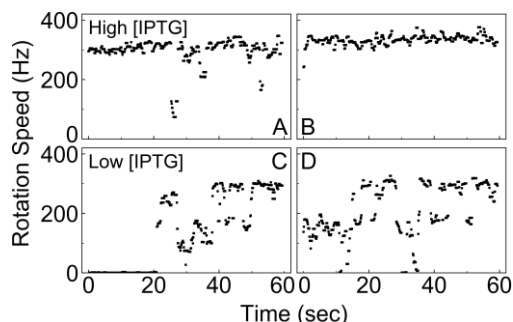


図3 固定子発現レベルに依存した回転速度の安定性 ((A,B)高発現時と(C,D)低発現時の代表例)

(3) 固定子発現量増加にともなう回転速度の段階的上昇

固定子の発現量とモーター回転速度の関係を1つのモーターにおいて観察した。固定子発現レベルの低い状況から、回転計測中に固定子ユニットの発現を誘導させるため、低濃度の培地と IPTG を混合した溶液を常時交換しながら、回転の経時的変化を観察した。その結果、低速度回転と回転停止を繰り返していたモーターは、時間の経過にともなう速度レベルが上昇し、回転停止頻度は低下した (図 4)。これは、固定子発現量増加により、固定子ユニットが同時に組み込まれる確率が増加したことによるものであると考えられる。

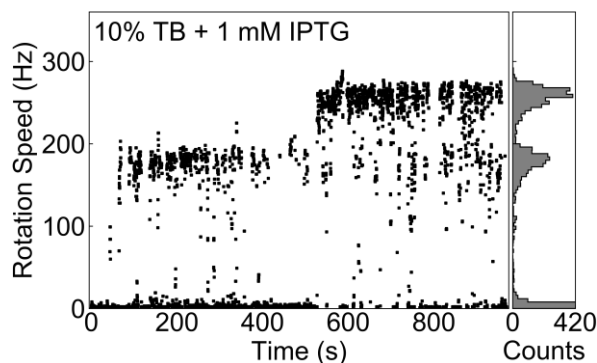


図4 固定子ユニット組み込み数増加により段階的に上昇するモーター回転速度

4. 結言

本研究では、現在実現可能な最も低負荷領域で駆動されるべん毛モーターの特性を計測できる系を構築した。また、べん毛モーターがほぼ無負荷条件下で駆動して最大速度を生み出すためには、複数の固定子ユニットが必要であることが示唆された。今後は、固定子ユニットに蛍光タンパク質を融合させ、回転計測と同時に蛍光観察をおこない、モーターへの固定子ユニット組み込み数を直接計測することを目指す。

謝辞: 本研究で使用した変異型べん毛フックは、南野徹准教授(大阪大学大学院)より提供していただきました。また、本研究で使用した大腸菌変異体は、同研究室所属の吉多美祐助教務助手に作製していただきました。深く感謝を申し上げます。

参考文献

- 1) Reid *et al.* (2006), *PNAS.*, **103**, 8066-8071
- 2) Ryu *et al.* (2000), *Nature*, **403**, 444-447
- 3) Wang *et al.* (2017), *PNAS.*, **114**, 12478-12482
- 4) Nord *et al.* (2017), *PNAS.*, **114**, 11603-11608
- 5) Hiraoka *et al.* (2017), *Sci. Rep.*, **7**, 46723